

# ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ И ИНГИБИТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СПЕКТРЫ ЕЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Иванова С. В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»

Исследование влияния условий хранения и замораживания таких биологических материалов, как сыворотка или плазма крови, имеет большое практическое значение, поскольку данный материал постоянно используется в клинической медицине [1, 2]. Исходя из этого, целью данной работы было установить возможные изменения спектральных характеристик и показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови людей при проведении процедуры замораживания-размораживания в обычных клинико-лабораторных условиях, а также при хранении в течение 30 суток.

Анализ спектров собственной флуоресценции сыворотки крови людей показал, что все исследуемые образцы имели аналогичную форму спектра с максимумом при 333 нм, что характерно для хромофорных аминокислотных остатков белков (в основном триптофана и тирозина) [3]. Однако интенсивность флуоресценции сыворотки крови в максимуме эмиссии достоверно снижалась после вторичного размораживания образцов на 8,8% по сравнению с образцами, размороженными один раз ( $p=0,007$ ) и на 9,2% по сравнению с сыворотками, не подвергавшимися заморозке (0-е размораживание,  $p=0,017$ ; табл. 1). Таблица 1 – Изменение интенсивности флуоресценции  $I_{333}$  сыворотки крови при многократном размораживании ( $n=10$ ).

№ группы	Количество процедур размораживания	$I_{333}$		
		Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	4,68	4,52	4,91
2	1	4,66	4,52	5,20
3	2	4,25 <sup>1,2</sup>	3,68	4,50
4	3	4,31 <sup>1,2</sup>	3,67	4,51

Примечание: <sup>1</sup> – достоверность различий по сравнению с 1-ой группой ( $p<0,02$ ); <sup>2</sup> – по сравнению со 2-ой группой ( $p<0,02$ )

Аналогичные результаты наблюдались для показателя  $I_{333}$  при трехкратном размораживании образцов сыворотки крови: уменьшение интенсивности флуоресценции на 7,5% по сравнению с сыворотками, размороженными один раз ( $p=0,017$ ) и на 7,9% – по сравнению с сыворотками, не подвергавшимися заморозке ( $p=0,017$ ). Однократное размораживание сыворотки не имело достоверных различий по показателю  $I_{333}$  от образцов сыворотки крови, не подвергавшихся заморозке.

Анализ протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови при многократном размораживании выявил следующие изменения (табл. 2). Общая протеолитическая активность образцов сыворотки крови (ОПА) достоверно уменьшалась после 3-го размораживания: на 54% по сравнению с

сыворотками, которые не подвергались замораживанию ( $p=0,007$ ) и на 40% по сравнению с образцами сывороток после первого размораживания ( $p=0,017$ )

Таблица 2 – Изменение показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови при многократном размораживании ( $n=10$ ).

№ группы	Количество процедур замораживания	Показатели протеолитической активности								
		ОПА			АПИ			$\alpha$ -2-MI		
		Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	7,37	5,18	15,64	1,50	0,73	1,88	1,08	0,93	1,22
2	1	5,67	5,12	12,47	1,83	1,17	2,12	1,04	0,96	1,28
3	2	5,10	1,70	13,61	2,76 <sup>1</sup>	2,00	2,91	1,09	1,03	1,12
4	3	3,40 <sub>1,2</sub>	0,57	5,10	2,89 <sup>1,2</sup>	2,14	3,21	1,00	0,97	1,06

Примечание. Достоверность различий по сравнению: <sup>1</sup> – с 1-ой группой ( $p<0,02$ ); <sup>2</sup> – со 2-ой группой ( $p<0,02$ ).

Содержание антипротеиназного ингибитора (АПИ) в сыворотке крови достоверно увеличилось на 84% ( $p=10^{-4}$ ) и на 93% ( $p=4,4 \cdot 10^{-3}$ ) после двукратного и трехкратного размораживания соответственно по сравнению с образцами, не подвергавшимися замораживанию и на 58% после третьего размораживания по сравнению с однократно размороженными сыворотками ( $p=0,017$ ). Содержание  $\alpha$ -2-макроглобулина (МГ) не имело достоверных различий между исследуемыми группами сравнения. Следовательно, однократное размораживание сыворотки крови не приводит к изменениям интенсивности флуоресценции в максимуме спектра и показателей ее протеолитической и ингибиторной активности. Достоверные изменения данных параметров наблюдаются только при дальнейшем повторении процедуры замораживания-размораживания сыворотки.

Результаты измерений интенсивности флуоресценции сыворотки крови людей в максимуме эмиссии ( $I_{333}$ ) для различных сроков хранения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции ( $I_{333}$ ) сыворотки крови от длительности хранения при  $t=-20^{\circ}$  ( $n=15$ ).

№ группы	Длительность хранения (сутки)	$I_{333}$		
		Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	4,68	4,52	4,91
2	2	4,66	4,38	5,11
3	6	4,62	4,24	5,08
4	9	4,34 <sup>3</sup>	3,84	4,53
5	15	4,78	4,54	5,36
6	30	4,66	4,52	5,20

Примечание: <sup>3</sup> – достоверность различий по сравнению с 5-ой группой ( $p=0,007$ )

Достоверные изменения по показателю  $I_{333}$  наблюдались только между группами образцов, хранившихся 9 и 15 суток: на 9-е сутки хранения интенсивность флуоресценции была ниже на 9%, чем на 15-е сутки ( $p=0,007$ ). Причем при дальнейшем хранении сыворотки в замороженном виде (15 и более суток) данный показатель возвращался к уровню флуоресценции сывороток, хранившихся 0-6 суток. Анализ показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови людей с различными сроками хранения выявил следующие закономерности (табл. 4)

Таблица 4 – Зависимость показателей протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови от длительности хранения сыворотки крови при  $t=-20^{\circ}$  ( $n=15$ ).

№ группы	Длительность хранения (сутки)	Показатели протеолитической активности								
		ОПА			АПИ			$\alpha$ -2-МГ		
		Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль	Me	10 процентиль	90 процентиль
1	0	7,37	5,18	15,64	1,50	0,73	1,88	1,08	0,70	1,40
2	2	6,81	2,27	14,74	1,20	0,67	1,77	0,84	0,62	1,35
3	6	3,40	1,70	8,51	1,33	0,39	1,78	1,12	0,99	1,50
4	9	5,10	1,7	11,91	2,06*	1,79	2,98	1,05	0,75	1,15
5	15	5,10	1,36	13,05	1,33	1,27	2,38	0,99	0,88	1,08
6	30	5,67	4,53	12,47	1,83	1,17	2,12	1,04	0,84	1,48

Примечание: \* – достоверность различий по сравнению с 2-ой группой ( $p<0,005$ ). – по сравнению с 3-ой группой ( $p<0,005$ ).

По уровню ОПА и содержанию  $\alpha$ -2-МГ в сыворотке крови достоверных изменений между группами сравнения во все сутки хранения не наблюдалось. Содержание АПИ достоверно увеличивалось на 72 % на 9-е сутки хранения по сравнению с образцами сыворотки крови, хранившимися двое суток ( $p=0,005$ ) и на 55% по сравнению с образцами, хранившимися 6 суток ( $p=0,003$ ). В остальные сроки хранения достоверных различий между группами по данному показателю не наблюдалось. Следовательно, можно считать, что длительность хранения сыворотки крови в течение 30 суток в замороженном состоянии при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  практически не влияет на интенсивность флуоресценции и на протеолитическую и ингибиторную активность данного биологического материала (за исключением девятих суток хранения).

Литература:

1. Дюбко, Т. С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков / Т. С. Дюбко // Вестник харьковского национального университета им. В. Н. Каразина. – Сер. биология. – 2006. – № 729. – Вып. 3. – С. 221–231.
2. Влияние замораживания на плазму донорской крови / Т. С. Дюбко [и др.] // Вестник харьковского национального университета им. В. Н. Каразина. – Сер. биология. – 2006. – № 748. – Вып. 4. – С. 128–133.
3. Черницкий, Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск, 1972. – 278 с.